

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-327598
(43)Date of publication of application : 17.11.1992

(51)Int.Cl. C07K 13/00
C12N 15/12
// C12P 21/02
(C12P 21/02
C12R 11/19)

(21) Application number : 03-095285

(71)Applicant : SHIONOGI & CO LTD

(22) Date of filing : 25.04.1991

(72)Inventor : IMURA HIROO
NAKAO ICHIKAZU
NAGATA KIYOSHI

(54) HUMAN C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a novel peptide useful as an agent for the detection and determination of rat C-type natriuretic peptide(CNP) and various reagents, etc., from a human genom DNA library by using the DNA sequence of the CNP as a probe.

CONSTITUTION: A human genome DNA library prepared by using a bacteriophage vector is screened by plaque hybridization using a DNA fragment of a rat C-type natriuretic peptide (rat CNP) as a probe to select a positive clone and separating the DNA from the clone by conventional process. The DNA is treated with restriction enzyme and linked with a manifestation vector to prepare a recombinant DNA containing a DNA coding a human C-type natriuretic peptide (human CNP). The recombinant DNA is introduced into *E.coli* and the obtained transformant is cultured to obtain a human CNP having the amino acid sequence from the 74th aspartic acid to the 126th cysteine of the sequence of formula.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

(Date of registration)

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(10) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-327598

(43) 公開日 平成4年(1992)11月17日

(61) Int.Cl.⁵
 C 07 K 13/00
 C 12 N 35/12
 // C 12 P 21/02
 (C 12 P 21/02
 C 12 R 1:19)

識別記号

序内登録番号

7731-4H

ZNA

8214-4B

F 1

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平3-95285

(22) 出願日 平成3年(1991)4月25日

(71) 出願人 000001928

塩野義製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番6号

(72) 発明者 井村 裕光

京都府京都市左京区一乗寺北大丸町59-2

(72) 発明者 中尾 一和

京都府京都市西京区大枝北宿町4-1-2

2

(72) 発明者 永田 橋

兵庫県神戸市垂水区小森山6-10-16

(74) 代理人 弁理士 山本 秀策 (外1名)

(50) 【発明の名称】 ヒトC型ナトリウム利尿ペプチド

(37) 【要約】

【構成】 ヒト由来の22個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列、該22個のアミノ酸を含む53個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列、および該53個のアミノ酸を含む126個のアミノ酸でなるプレプロ型のC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列が提供される。上記DNA配列は、ヒトゲノムDNAライブラリーから、ラットCNPのDNA配列をプローブとして使用して得られた。

【効果】 ヒトCNPもしくはそのDNA配列を利用して、検体中のCNPの検出、測定がなされ、あるいはCNPを含む各種試薬などが調製され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1の74位のアスパラギン酸から126位のシスティンまでのアミノ酸配列を有するヒトC型ナトリウム利尿ペプチド。

【請求項2】 配列番号1の1位のメチオニンから126位のシスティンまでのアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のヒトC型ナトリウム利尿ペプチド。

【請求項3】 請求項1または2に記載のヒトナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列。

【請求項4】 配列番号1の623位のGから687位のTまでのDNA配列でなる、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列。

【請求項5】 配列番号1の1位のGから2473位のCまでのDNA配列を含む、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列。

【請求項6】 配列番号1の1位のGから2917位のCまでのDNA配列を含む、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするヒトゲノム由来のDNA配列。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒト由来の22個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列、該22個のアミノ酸を含むる3個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列、および該3個のアミノ酸を含む126個のアミノ酸でなるブレブロ型のC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列に関する。

【0002】

【従来の技術】 最近ブタの脳から新規なナトリウム利尿ペプチドが単離された。この新規なペプチド群はC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)と呼ばれる。ブタCNPには、1個の分子内ジスルフィド架橋(アミノ酸17残基でなる環状構造を形成する)を含み22個のアミノ酸残基を有するペプチド(ブタCNP)と、該CNPのN末端が延長されて合計で3個のアミノ酸残基を有するペプチド(ブタCNP-53)とがある。上記CNPの環状部分は、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)および肺性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)と高い相間性を有する。CNPはANPおよびBNPと同様に、心臓血管動的平衡の調節に関与すると考えられるが、培養された血管平滑筋細胞中でナトリウム利尿ペプチドのセカンドメッセンジャーであるサイクリックGNPの産生をより高めることから、ANPおよびBNPとは異なる機能を有することが示唆される。

【0003】 Tawaragiら(Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 172, No. 2, 1990)は、上記CNP-53のN末端配列およびC末端をもとにPCR反応を利用して、ブ

タCNPをコードするゲノムDNAおよびcDNAを単離している。これらのDNAの解析から126個のアミノ酸でなるブレブロCNPの存在が明らかにされている。FEBS LETTERS, Vol. 276, 299-213 (1990) では、ラット脳cDNAライブラリーを用いて、ブタCNP-53のN末端配列をもとにPCR反応を行い、ラットCNPのDNA配列が明らかにされている。このDNA配列からラットCNPにおいても22個のアミノ酸残基を有するペプチド(ラットCNP)、53個のアミノ酸を有するペプチド(ラットCNP-53)、および126個のアミノ酸残基を有するペプチドの存在が明らかとなった。ブタCNPおよびラットCNPのコード領域のDNA配列を配列番号3および4にそれぞれ示す。これらの配列の比較から明らかなように、コード領域は約90%の相間性を有し、対応するアミノ酸配列については、それぞれのCNP-53は完全に一致することがわかる。

【0004】 上記のように、ブタおよびラットのCNPについてのいくつかの情報が明らかにされているが、ヒトについてはこのようなCNPの存在およびDNA配列についての知見は得られていない。ヒトCNPの存在もしくはDNA配列が明らかになれば、これを各種試験、薬剤などに利用し得ると考えられる。

【0005】

【発明の目的】 本発明の目的は、ヒト由来のC型ナトリウム利尿ペプチド(ヒトCNP)のDNA配列を明らかにすることである。

【0006】

【発明の構成】 発明者らはヒトゲノムDNAライブラリーをラットCNPのcDNA断片を用いたスクリーニングに供し、ヒト由来のCNPのDNA断片を得て、その配列の決定を行うことにより、本発明を完成するに至った。

【0007】 本発明のヒトCNPは配列番号1の74位のアスパラギン酸から126位のシスティンまでのアミノ酸配列を有する。

【0008】 本発明のヒトCNPはまた、配列番号1の1位のメチオニンから126位のシスティンまでのアミノ酸配列を有する。

【0009】 本発明のDNA配列は、上記ヒトCNPをコードする。

【0010】 本発明のDNA配列は、配列番号1の623位のGから687位のTまでのDNA配列でなる、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードする。

【0011】 本発明のDNA配列はまた、配列番号1の1位のGから2473位のCまでのDNA配列を含む、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードする。

【0012】 本発明のDNA配列はまた、配列番号2の1位のGから2917位のCまでのDNA配列を含む、ヒトC型ナトリウム利尿ペプチドをコードする。

3

【0013】本発明のヒトCNPのcDNA配列の同定、およびヒト脳におけるCNP総活性の検出を以下に示す。

【0014】(1)ラットCNPをコードするcDNA断片の調製

ラットの脳から細胞の全RNAを常法により抽出する。次いで既知のラットCNPのDNA配列(FIBS LETTERS, 前出)のコード領域の5'末端付近の配列を含む断片(プライマー)および2'末端付近の配列に相補的な配列を含む断片(アンチセンスプライマー)を合成する。プライマーおよびアンチセンスプライマーのDNA配列を配列番号5および6にそれぞれ示す。これらのプライマーおよびアンチセンスプライマーを用いてPCR反応を行う。得られたPCR産物を適当な制限酵素で切断し、ラットCNPのcDNAの全ペプチドをコードする領域に対応する378個の塩基対を有するDNA断片を得る。所望のDNA断片が得られたことは配列分析により確認される。

【0015】(2)ヒトゲノムDNAライブラリーのスクリーニングおよびヒトCNPをコードするDNAの配列決定

(1)上で得られたラットcDNA断片をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、約15kbの遺伝子断片(人HCNP14)を得る。この断片をBamH1およびSalIで消化することにより得られる断片(約3.0kb)をサブクローニングし、ジデオキシン法により配列の決定を行う。このようにして得られた2.917kbのDNA配列および推定されるヒトCNPのアミノ配列を配列番号2に示す。イントロンと推定される部分を除くヒトCNPのcDNAの配列を配列番号1に示す。

【0016】(3)ヒトCNPのDNA配列の解析

配列番号2に記載のように、ヒトCNPのDNA配列は、少なくとも2個のエキソンと1個のイントロンとを有すると考えられる。イントロンは400番目のGから843番目のGまであると考えられる。このイントロンの位置は、このゲノムDNAの配列とラットCNPのcDNA配列とを比較することにより決定された。エキソンとイントロンとの境界には、スプライシングドナー(AAG/GTGGGT; 397~405番目の塩基)およびスプライシングアクセプター(CAG/G; 841~844番目の塩基)が存在する。RNAポリメラーゼIIの結合に関与しているTATAAA配列(TATAボックス)は124~139番目の塩基の位置にある。さらに、逆向きのCCAAATボックス(Yボックスのコア配列)、2個のGCボックス、およびサイクリックAMP応答要素(CRE)様配列が、5'隣接領域に存在する。このようなCCAAATボックスおよびサイクリックAMP応答要素配列は、ANPおよびBNPの上流配列には存在しない。CNPの開始コドン(ATG)は

4

310~312位に存在する。第1のエキソンは、5'非翻訳領域、シグナルペプチド(最初の疎水性アミノ酸23個)をコードするDNA配列、および成熟ペプチドの最初のアミノ酸7個をコードするDNA配列を有する。第2のエキソンは、CNPの成熟ペプチドの8番目のアミノ酸であるバリンをコードするGTCから終止コドンであるTAGまでのDNA配列を含み、さらに、3'非翻訳領域を含む。このDNA配列においては、3'非翻訳領域に、典型的なポリアデニル化シグナル(AATAAA)が翻訳終止コドンの約1300bp下流までの領域には見い出されなかった。このことにより、ヒトCNP遺伝子は長い3'非翻訳領域を有すること、および/または3'非翻訳領域に第3のイントロンが存在することが示唆される。ちなみに、ANPおよびCNPについて、3個のエキソンと2個のイントロンとを有し、第3のエキソンはC末端延長コード領域(CNPには存在しない)を有する。

【0017】上記遺伝子構造から、ヒトCNPとしては配列番号1に示すように、1番目のアミノ酸であるMetから126番目のCysまでの126アミノ酸であるプレプロ型のCNP、74番目のAspから126番目のCysまでの53アミノ酸であるCNP(ヒトCNP-53)、および106番目のGlyから126番目のCysまでの22アミノ酸であるCNP(ヒトCNP)が存在することがわかる。上記CNP-126の最初の23アミノ酸残基は疎水性に富むことからシグナルペプチドであると考えられる。23番目のAlaと24番目のIysとの間で開裂が起こりプロCNPが生じると考えられる。

【0018】上記3種のアミノ酸配列を、配列番号3に記載のブタCNPのDNA配列に対応するアミノ酸配列、および配列番号4に記載のラットCNPのDNA配列に対応するアミノ酸配列とそれぞれ比較すると、CNPについては、そのアミノ酸配列がすべて同一であることがわかる。CNP-53については、ヒトとラットとで2個、そしてヒトとブタとでも2個のアミノ酸の相違がある。プレプロCNPについては、ヒトとラットとで8個、そしてヒトとブタとでは5個のアミノ酸の相違がある。それぞれのDNA配列(開始コドンからTAGまで)を比較するとヒトとラットとでは94% (CNP)、94% (CNP-53) および89% (プレプロCNP) の相同性があり、ヒトとブタとでは95% (CNP)、95% (CNP-53)、および93% (プレプロCNP) の相同性がある。特に、5'隣接領域、およびシスエレメントの配列がヒトおよびブタCNPにおいてよく保存されており、CNPのDNA配列は、ナトリウム利尿ペプチド群のなかで最も保存性が高いことがわかる。

【0019】(4)CNP総活性の検出方法
ヒトCNP総活性は、上記DNA配列に基づいてCNP

ペプチドを合成し、これを用いて得られる抗血清を用いた免疫反応により検出される。例えば、CNPあるいは[Tyr¹] - CNP (CNPのN末端にTyr¹が結合したペプチド) を固相法により化学合成し、これをマウスに投与して得られる抗血清を用いてラジオイムノアッセイ (RIA) を行うことにより検出される。RIAは、ANPを検出するためのRIAの方法 (J. Clin. Invest., 81: 1962-1970) に準じて行われる。上記方法によるCNP様活性において、最小検出限界は2.0 fmol/チューブであった。CNP様活性のヒトANPおよびヒトBNPに対する交叉反応性は、それぞれ0.3%および0.01%未満であった。50%結合阻止濃度 (CNP抗体と標識CNPとの結合が50%阻止されるCNPの濃度) は3.0 fmol/チューブであり、変動係数は、同じ系で同日に続けてこの実験を9回行った場合が8.7%，そして同じ系を作成して別々の日に8回にわたり行ったところ9.1%であった。

【0020】同様に、ヒトANPについてのRIAにおいて、ヒトBNPおよびCNPとの交叉反応性はそれぞれ0.01%未満であり、BNPについてのRIA (J. Clin. Invest., 印刷中)において、ヒトANPおよびCNPとの交叉反応性は、それぞれ0.01%未満および1%未満であった。

【0021】(5)ヒト臍におけるCNP様活性の検出ヒトの臍の抽出物を固相高速液体クロマトグラフィーにかけ、各フラクションについて、CNP様活性を、上記(4)項のRIAの方法により調べた。図1に得られたCNP様活性を示す。CNPを化学合成し、同一条件下HPLCにかけたところ保持時間4.8分で溶出されたため、これがCNPに相当するピークであると考えられる。6.6分に溶出されたフラクションのピークは、既知のブタCNPとの比較からCNP-53であると考えられる。図1における絞線はCNPの検出限界を示す。

【0022】次にヒトの臍の異なる組織からの抽出物のそれについて、上記(4)項のRIAの方法によりCNP様活性を調べた。ANP様活性およびBNP様活性についても同様に調べた。その結果を表1に示す。

【0023】

【表1】

臍の部位	CNP様活性	ANP様活性	BNP様活性
大臍皮質	0.01	< 0.07	< 0.06
臍皮	2.80	< 0.07	< 0.06
臍床下部	1.03	0.13	< 0.06
中臍	1.28	< 0.07	< 0.06
臍根	< 0.4	0.15	< 0.06
臍縫	2.78	0.08	< 0.06
小臍(皮質)	< 0.86	0.07	< 0.06

(単位: pmol/組織湿重量)

【0024】表1から、ヒト臍内におけるCNP様活性のレベルはANP様活性及びBNP様活性よりも1桁高く、このことからCNPは主として臍内で生じる主要な

ナトリウム利尿ペプチドであると考えられる。CNP様活性は、特に、臍床下部、中臍、臍床および臍縫において高いレベルであることがわかる。これに対して、ヒトの心臍およびプラズマからは高レベルのCNP様活性が検出されない。従って、CNPは、BNPがヒトおよびラットの心室から分泌されるのとは全く異なる組織特異的発現性を有することがわかる。

【0025】上記のように、CNPのDNA配列は、ANPおよびBNPのDNA配列には存在しないCCAAATTボックスおよびサイクリックAMP応答要素配列を有する。このことはCNPの発現の制御機構がANPおよびBNPのそれとは異なっていることを示唆する。最近、Andersonらにより、2個並んだCRE配列と、CCAAATTボックスと、その間の連続調節要素とよばれる配列 (シスエレメント) とが、糖タンパクα-サブユニット遺伝子の組織特異的発現を増大させることができた (J. Biol. Chem., 265: 21876-21880)。発明者は、CNP様活性は、ラット臍下垂体の前葉に最も多く存在することを実験により確かめており、このデータをあわせて考えると、上記シスエレメントは、CNP遺伝子の組織特異的な発現性を付与すると考えられる。

【0026】

【実施例】以下に本発明を実施例につき説明する。

【0027】(実施例1)

(1) ラットCNPをコードするcDNA断片の調製ラットの臍から細胞の全RNAを4Mグアニジンチオシアネットバッファーを用いて抽出した。次に、下記のセンスプライマーAおよびアンチセンスプライマーB (配列番号5および6に示される) を化学合成した。

【0028】センスプライマーA

ATATGAGCTCATGCCACUTCTCCGAGCTGATC

アンチセンスプライマーB

TAGCGTGGACAACTACATCCCAGACCCUTCAT

プライマーAは、既知のラットCNPのDNA配列 (P. E. B. S. LETTERS, 前出) のコード領域の5'末端付近の配列であり、プライマーBは3'末端付近の配列に相補的な配列であり、それぞれ5'端および3'端上1で制限部位が付加されている (下線部)。モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素 (Bethesda Research Laboratories Inc., Gaithersburg, MD) を用いて、オリゴ(dT) プライミングによって、5 μgの全RNAの逆転写を行った後、得られた一本鎖のcDNAを標準的な条件下でPCR反応に供した。増幅後、そのPCR産物をS. a. c. IとS. a. Iとで消化して、調製用の1.0%アガロースゲル電気泳動により単離した。その単離されたDNA断片を、増幅のためにpUC119またはpBlue script (Stratagene, La Jolla, CA) にサブクローン化した。このようにして、ラットCNP cDNAの全ペプチドをコードする領域に対応する378bp

の断片が得られた。このことは上記配列を分析することにより確認された。

【0029】(2)ヒトゲノムライブラリーのスクリーニングおよびヒトCNPをコードするDNA配列の決定
ヒトゲノムDNAライブラリー(Clonitech Inc., Mountain View, CA)を、ハイブリダイゼーション用プローブとしてPCRで増幅された上記ラットCNP cDNA断片を用いて次のようにスクリーニングした。

【0030】まず、バクテリオファージEMBL-3ベクターを用いて作成された上記ヒトゲノムDNAライブラリーを、*E. coli* LILLE392株に導入した。これをColony/Plaque Screenフィルター(Du Pont, Boston, MA)へ、二本鎖の状態で移した。フィルターと結合したDNAを変性させ、UV照射によって固定した(Stratalinker, Stratagene, La Jolla, CA)。そのフィルターを、50mMトリス緩衝液(pH7.5)、1M NaCl、10%デキストラン醣、1% SDS、200μg/ml酵母tRNAおよび200μg/ml剪断サケ精子DNA含有の溶液中で60°Cにおいてプレハイブリダイズした。次に、上記プレハイブリダイゼーション溶液に³²P標識した上記ラットCNP cDNAプローブを加え、この容器を用いてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの後、そのフィルターを0.5×SSC(1×SSCは0.16MNaCl、0.016Mタエン酸ナトリウム)、0.1% SDSにより、45°Cで3回洗浄した。スクリーニングの2段階目において、フィルターを更に厳しい条件のもとで洗浄した(0.2×SSC+0.1%SDSにより、50°C 3回)。

【0031】約1×10⁶個のクローニングし、9個の陽性のクローニングを得た。このクローンは、ヒトANP cDNAプローブおよびヒトBNP cDNAプローブ(J. Clin. Invest. 印刷中；およびJ. Clin. Invest. 83:298-306)と交叉ハイブリダイゼーションを行わなかった。1つのクローン(λHCNP141)由来で約1.6kbのヒトCNP遺伝子断片を有するDNAおよび該DNAの約3.0kbのBamHI-SalI消化断片をさらに次のように分析し、配列を決めた。

【0032】上記DNA断片をB1nucscriptまたはpUC119ベクターへサブクローニングし、ジデオキシン鎖停止法によってDNAの配列決定を行った。二本鎖DNAの両方の鎖を解読することにより上記DNA配列の正しいことが立証された。

【0033】(3) CNP様活性の検出

ヒトの脳および他の臓器は相補的合併症を併わない死体の解剖によって得た。得られた脳および他の臓器をただちに液体チッソで凍結し、使用時まで-70°Cで保存した。上記臓から抽出物を下記の条件により速相高速液体クロマトグラフィーにかけた。上記HPLCはN

ucleosil 5C₁₈カラム(4.6×150mm, Macherey-Nagel, Duren, Germany)を用い、0.1%トリフルオロ酢酸中でアセトニトリルを20~40%に増加させるリニアグラジェント法で行った。各フラクションについて、「発明の構成」の項で述べた標識CNP抗体を用いたRIAによりアッセイを行い、CNP様活性の測定を行った。その結果を図1に示す。CNPを化学合成し、同一条件でHPLCにかけたところ保持時間4.8分で溶出された。従って、この位置に現れるピークがCNPであると考えられる。保持時間6.6分で溶出されたフラクションのピークは、既知のブタCNPとの比較からCNP-β3であると考えられる。図1における破線は、CNPの検出限界を示す。

【0034】次にヒトの脳の異なる領域からの抽出物のそれについて上記と同様のRIAの方法によりCNP様活性を調べた。ANP様活性およびBNP様活性についても同様に調べた。その結果、「発明の構成」の表1に示す活性が測定された。この表からヒト脳内におけるCNP様活性のレベルはANP様活性及びBNP様活性よりも1軒高く、このことからCNPは主として脳内で生じる主要なナトリウム利尿ペプチドであると考えられる。CNP様活性は、特に、視床下部、中脳、視床および延髄に高いレベルであることがわかる。

【0035】

【発明の効果】本発明によれば、このように、ヒト由来の22個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドをコードするDNA配列、該22個のアミノ酸を含むる3個のアミノ酸でなるC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列、および該63個のアミノ酸を含む126個のアミノ酸でなるプレプロ型のC型ナトリウム利尿ペプチドおよびそれをコードするDNA配列が得られる。これらを用いて検体中のCNPの検出、測定、あるいはCNPを用いた各種試薬、薬剤などが調製可能となる。

【0036】

【配列表】

【0037】

【配列番号:1】配列の長さ:2473

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA to genomic DNA

起源:ヒト

配列の特徴

特徴を表す記号:CAAT signal

存在位置:81..85

特徴を決定した方法:S

特徴を表す記号:GC signal

存在位置:89..94、および101..106

9

10

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: CDS

特徴を表す記号: TATA signal

存在位置: 310..690

存在位置: 134..139

特徴を決定した方法: S

特徴を決定した方法: S

配列

GGATCCCTCC GGGCTGGAT AAGGGAGGGG AGCCCCCGG GCGCCCTCCGC	60
GGCCCGCTG CGCTGGCTGC ATTGGCCCGG GGGCCCGCTG CGCTGGCTGC ATTGGCCCG	120
CGCCAGGTTG GATTATAAAGG GCGGAAACAG AGTCACGGGC TCAGAGACCA CGCAACCGGC	180
GGGGCCCGAG ACTGGGACCC TCTCTGGCTG GCAAGCCCGAG CAGCGCTGCTG CGGATCCCGCC	240
TGCTGCTTG CGCGCGGCCG TCGGGCGCTG CGCTGGCCCG CGCTGGCCCG CGCTGGCCCG	300
AGGGCCAGG ATG CAT CTC TCC CAG CTG CGC TGC CGC CTG CTC CTC	348
Met His Leu Ser Gln Leu Leu Ala Cys Ala Leu Leu Leu	
1 5 10	
AGG CTC CTC TCC CTC CGG CCC TCC GAA GGC AAG CCC GAG GCG CGG CGG	336
Thr Leu Ser Leu Arg Pro Ser Gln Ala Lys Pro Gly Ala Pro Pro	
15 20 25	
AAG GTC CGG CGA ACC CGG CGG GCA GAG GAG CTG GCG GAG CGG GAG GCT	444
Lys Val Pro Arg Thr Pro Ala Glu Glu Leu Ala Glu Pro Gln Ala	
30 35 40 45	
GCG GGC GGC GGT CAG AAG AAG GGC GAC AAG GCT CCC GGC GGC GGC	492
Ala Gly Gly Gln Lys Lys Gly Asp Lys Ala Pro Gly Gly Gly	
50 55 60	
GCG AAT CTC AAG GGC GAC CGG TCG CGA CTG CTC CGG GAC CTG CGC CTG	540
Ala Asn Leu Lys Gly Asp Arg Ser Arg Leu Leu Arg Asp Leu Arg Val	
65 70 75	
GAC ACC AAG TCG CGG GCA GCG TGG GCT CCC CTT CTG CAA GAG CAC CCC	588
Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Gln His Pro	
80 85 90	
AAC GCG GCG AAA TAC AAA GGA GGC AAC AAG AAG GGC TTG TCC AAG GGC	626
Asn Asn Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly	
95 100 105	
TGC TTC CGC CTC AAG CTG GAC CGA ATC GGC TCC ATG ACC GGC CTG GGA	684
Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Ser Gly	
110 115 120 125	
TGT TACTGGGGG CGCGCTGGCG CGCGCTGAGTA CGGGCCACCC GACGGCCAGC	737
Cys	
126	
CGGAGGCGG CGGGGACCG CGCGCGCCG AGCGGGCTTC GGAGGGGGG GAGGGCGCTT	737
TGCTCAAGTT GTCGCTGGCG TTTCGCAAGG GCGCCCTTIA TTATCCACT TTACAGACAA	857
AGAAACCGAA GGATAAAGTG ATCGGGGAAC TTTCGCAAGG TCAGAAACGG CTGAGCTTG	917
TTGAACCCAC CTGGCTCTCTT CGGGAGAAGG AGAACACAGGC TTGGTGCTGT CTGACCCAC	977
CTGGAAACCT AGCTGAAGTA GGACGACTGG CGCGTATGG CGACGCTGGG CGGGGATTGA	1037
GAGGAGATCA TGCGTTTG TG CGCGAGAGA AGGAAGGTTA CACCCACAAG TGAAGGGAC	1097
ATCGATCAAC TTCTGGCCAC CTCGCGCTT CTGCTGAGAG TACCGCTCTG CTGGAGCTGT	1157
CGGGCGCCG CTGCGCTGG ACACCTGGAT TCTGCTGGCT TCTCTAAAGC CGGGCGCTGG	1217
CGAAAGCTGCT CGTGTGCGGG CGCGAGGCGA CGTGCAGCGT CGTGCCTGG CGGGGTGAATC	1277
TCAGCTCTTG TCGCTGCTT CGACGAAATA GAAAGACAC TAAAGTAAAT ATTATTCGCC	1337
CCAGCCCTGA ATCGAGACCG TCCGAAAGTC CGTCACCCAC CGTCGCCCCA CGAACCGCT	1397
CGCTGGGGT CGCTTCTGG TGCGGGCTGT CGACGCGAC TAGCGCTGGG AACCTCTGGC	1457
CTACGGCGAC CGCTGGGGGG TGCGGGCTGG TGCTAATTGA CTGCTGAGA GACCGTACCC	1517
TGCTCTCTT CGCTCTCTC TATTCGCGC GCGCGGGT CGCCACTGAA TACATCGCA	1577

11

12

GGCTCTGACA TTGACAGTAA TTTGCGTTAG GATCAGGGTT ACCTGCGTTT CTCGCGTTCT
 TGCCTCGAGC TCAGGAGCTG GAACTGCGTG TCCCACACCT TGACTGTCGC ATGCCAGGCT
 ACCGGCAAGC TGCTGTCTCC TCCCAGAAA CCCTTGTCAG TGCTGGATCT TCTCCGGAG
 GAAACAAAGAG CGTGTGTCGA GCACACTGTT TCTTTTTTAC AGTACGAAAC ACTTTTTAAC
 AGTTTGAA CGCATTCACC TCTCCATATT GAAACAGCTTA AGGGCGAAGT GCTGGCGTAA
 CGGACTTCTG GACCCACTG ACGCGAAACA GACTUGTGA AATATTGTC ATGACCGA
 GAAACAGCA CACCGTGGCC CAGCGACTG CCACGTGCC GAGGGTTTAA CCAGTGCCCT
 TGTCTCTT GCAACGAGAC CTCACCTGGG TGTCGGCCCT TGCGGAGTC TGCAAAAGCT
 GTAGTTGCTG GTGAGCTTGA CTCCTGGCTG GACAGGGAGA AGAAATGATC TGACACTGG
 GGACCACTG TCACTGAGA GCTTGAATT GCCTTGGTC TCTCTCTCC TGTCTAAACA
 ACAAAGAACG GGAGTCGAG GCTCAATT TCTAGTTGA TTTAACCGTC AGTTCAAAC
 TTTAGAACCT GACCAAAATGT TGTGACTCT CGATGGTC TGACCTGGAA TGCGATCA
 CGGGCGCTT GTTCTGGCC CTGCGATCT GTGTCACCA AGTGAAGGCC AACCGGGTUG
 TGAAGATCC TGTCGAGAG GAAACCAATG TGTAAAGAT TCTGGACCC TTTGATCAGG
 GGGTCAAT AACCTCTAC GACCTCTT GACATAGATG AACACTTACG GTCGAC 2473

[0036]

[配列番号: 3] 配列の長さ: 3917

配列の類: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 離鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源: ヒト

配列の特徴

特徴を表す記号: CAAT signal

存在位置: 89..94, および101..106

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: TATA signal

20 存在位置: 134..139

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 310..399, および844..1134

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: G/C signal

特徴を表す記号: intron

存在位置: 81..85

存在位置: 400..643

特徴を決定した方法: S

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: TATA

配列

GGATCTTC GGGCTGGCAT AAGGACGGG ACCCCCCCGG CCCCGCTTCC GCGCCCTGGC 60
 GGGGGCGT GCGTGGTGTG ATTCGGCGG GCGGCGCGGT GGGCGGGAGG ATGACATAG
 CGCCAGCTG GATTATAAGG GGGGAGGAG AGTCACGGGC TCGAGCGCA CCACGGGGC 120
 GCGCGCGACC ACTGGGAGGC TCTCCGGCTG CGACCGACAG CAGGGCTGTC CGCATCCCC
 TGCTGCTG CGCGCGACCG TCGGGCGCT GCGTGGCGCC CGTGTGGCCG CGTGTGGCC 240
 AGCGACAC ATG CAT CTC TCC CAG CTG CGC TAC GCC CTG CTG CTC 360
 Met His Leu Ser Gln Leu Leu Ala Cys Ala Leu Leu Leu

1 5 10

AAG CTC CTC TCC CTC CGG CCC TCC GAA GCG AAG CCC CGG CGG CGG CGG 396

Tyr Leu Leu Ser Leu Arg Pro Ser Gln Ala Ala Lys Pro Gln Ala Pro Pro

15 20 25

AAG GGGGGCTG TCTGGGGAC CGCGGACCTG GGAGAGGGT CGGAGGCTCG 438

Lys

20

GGGCTGGAG AATGGGGGCG CGACGACCA CGACGACGGG AAGGGAAGGG GCTGTGCTCT
 CGGACATGGC CGTGGCGAC AGCCGGGGAG CGCTCGAACG CGGGATTGCG CGTCCACTT 589
 CTCCACGCTC CGGAGAACAT CGGGGACATG CGAGGGCGCT ACCGGACTGT GCGCTGGCCG 629
 CGGAGACCA AAGGGAGGG AGGGGCTTC CGGAGGGAGC CGCGAGGGCG CGGGCGTGGC 669
 AGGGGATGC CGGGCGAGC TGGGGGGAT CGCTGGGGCG CGCTCGGGC TGGGGAGGA 749
 CACCCCCCCC CGGGGGGGCG GTGGGGCTG AGCATCAGAG TCCCCCGTGC TGAGGCGCG 809
 TGTCTCTCA CCTGGCGCTT CTTCCTCG ACAG GTC CGG CGA ACC CGG CGG CGA 841

Val Pro Arg Thr Pro Pro Ala

13

14

36

GAG GAG CTG GCC GAG CCG CAG GCT GCG GGC GGC GGT CAG AAG AAG GGC
 Glu Glu Leu Ala Glu Pro Glu Ala Ala Gly Gly Gly Glu Lys Lys Glu
 40 45 50
 GAC AAG GCT CCC CGG GGC GGG GGC GGC AAT CTC AAG GGC GAC CGG TCG
 Asp Lys Ala Pro Gly Gly Gly Glu Asn Leu Lys Glu Asp Arg Ser
 55 60 65
 CGA CTG CTC CGG GAC CTG CGC GTC GAC ACC AAG TCG CGG GCA CGG TGG
 Arg Leu Leu Arg Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp
 70 75 80 85
 CCT CGC CTT CTG CAA GAG CAC CCC AAC CGG CGC AAA TAC AAA GGA GGC
 Ala Arg Leu Leu Glu Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala
 90 95 100
 AAC AAG AAG GGC TTC TCC AAG GGC TGC TTC GGC CTC AAG CTG GAC CGA
 Asn Lys Lys Glu Leu Ser Lys Glu Cys Phe Glu Leu Lys Leu Asp Arg
 105 110 115
 ATC GGC TCC ATG AAG GGC CTG GGA TGT TACTGGGGCG CCCCCCTGGCG
 Ile Glu Ser Met Ser Glu Leu Glu Cys
 120 125 126
 GGGGTAGTA CGGGCGAGCC GACGGCGGAG CGGCGGCGGG CGGGGGGACCC
 ACCGGCGCTTC CGGAGGGGGCG GAGCGGCGCTT TGGCTCAAGTT GGGCTAGGGCG TTTGGCGAGCC
 GCGCGCTTTA TTATCCCACT TACAGACAA AGAAAGCGAA CGATAACGTG ATGGGGGAC
 TTGGGGGAGG TGAGAAAGGG CTCAGCGCTTG TTGAACCCAC CTCGGCTTCCTT CTGGAGGAGC
 AGAAACAGGC TTGGGGGTGT CTCACCCACC CGTGAACCGT AGCTGAACCTA CGACCACTGG
 CGCGTATGG CGACCTGTG GGGGGATTCA GAGGGATCA TGGGTGTTGTC GGGCGAGAGA
 AGGAAGGTAA CACCCACAG TCCAGGGGAC ATGGATCATC TGCTGGCCAC CAGGGGGCGT
 GTAGTGAGAA TACCCCTCTG CTCGACATST CAGGGGGCTT TGCGCTGGG ATAGTCGGAT
 TCGCTGCGT TCTCTAAACG CAGGGAGTGG GAAACTGGT CTGTCUAGGG TGCTGAGGA
 GTCGGCGCT CGTCGCTTGG GGGGTGAATC TCAGTGCTTG TGGCAUTATT TGACCGAATA
 GAAAGACAC TAAAGTAAT ATTATTTGCG CGACGCTGGA ACTCAACACG TCCAGAGTC
 CCTGACCAAC CCTGCTCCGA CGCAGCGCTG GCTCTGGCTCTG TGGGGGTCT
 CACCGGGGAC TACGGCTGGA AACCTCTGCG CTACCGGCGAC CGCTGGCGGG TGCGCGTGG
 TGGTAAATTG CTCGCTGAGA GAGGGTCAAC TCTCCCTCTG TATTCGCTCC
 CGCTGGCGT GGGCACTGAA TACATCCCA GGTUTGACA TTGACACTA TGCGCTTAG
 GATCAGGCTT ACCTGGTTT CTGGCTTCT TGGCTGAGC TCAGGAGCTG CGACTGGCTG
 TCCGAGACG TGACTGCTCC ATCCAGGCT ACGGGCAAGC TGCTGGCTCC TGCCAGAAA
 CGCTGGCGAG TGCTGGATCT TCTCCGGGG GAAACAGAG CGCTCTCCG GGGACATGTC
 TCTTCTTCTAC AGTACAGAAC ACTTTTTCAC AGTTTGAA CGGGATTCACCG TCTCCATATT
 GAAACGTTA AGGGCGAAGT GCTGGCTAA CGGACGTTAG GACCCACTGG AGGGCGAAC
 GACTGGTGA AATATTGTC AGTACGAGA GAAACGAGA CACCGTGGGC GATGGCACTC
 CGACCTGGCC GAGTTTAA CGACTGGCT TGCTCTCTT CGAGGAGAC CTGAGCTGGC
 TGCTGGCGTC TCCCGAGTC CGCAAGGGCT TGAGTGCTCT GGGCTGGCTG CTCGCTGGCG
 CACAGGGAGA AGAATGATTC TGAACTTGG CGACCGAGT TGCTAGGTA CGCTGGAGT
 CGCTTGCTG TGCTCTCTCC TGCTTAACCA ACAGAGAAC CGACTCTGAG CGCTCGAAATT
 TTGAGTGA TTAAGGCTT AAGTCAAC TTTAGGACCT GACCAAAATGT TGGTGGCTCT
 CGATGGTTC GTACCTGAA TGCGCATCCA CGGGCGCTT CTGGCTGGCG CCGGAGCTCT
 GTCAGTACCA ACTGAGTGGC AAACCGCTGG TAAAGGATCC TGCTAGGAG GATCCACAT
 TGTTAAGGAT TCTGGACCCCG TTGGATCAGG GGGCTCAAT AAGCTCCATC CGCTCTCTT
 ASCATAGATG AAGACTTACG CGCGAC
 2917

15

16

【0039】

【配列番号：3】配列の長さ：381

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：線状状

配列の種類：cDNA to genomic DNA

フラグメント型：中間部フラグメント

*起源：プラ

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..381

特徴を決定した方法：S

配列

ATG CAC CTC TCC CAG CTG CTG GCC TCC CCT CTG CTC ACG CTC CTC	48
TCC CTC CGG CCC TCC GAA GCC AAG CCC CGG CGG CGG AAG GTC CCT	96
CGA ACT CGG CCA CGG GAG GAG CTG CCT GAG CAG GCT GGC GGC GGC	144
GCT GAG AAG AAG GGC GAC AAG ACT CCT GGG GGC GGT GGC GGC AAC CTC	192
AAG GGC GAC CGG TCT CGA CTG CTC CGG GAC CTG CGG GTC GAC ACC AAG	240
TCT CGG CGG GGC TGG GGC CCT CTC CAC GAG AAC CCC AAC GGC GGC	288
AAA TAC AAA CGA CGC AAC AAG AAG GGT TTG TCC AAG GGC TGC TTC CGC	336
CTG AAA CTG GAC CGG ATC GGC TCC ATG AGC GGC CTG GGA TGT TAG	381

【0040】

【配列番号：4】配列の長さ：381

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：線状状

配列の種類：cDNA to genomic DNA

フラグメント型：中間部フラグメント

*起源：ラット

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..381

特徴を決定した方法：S

配列

ATG CAC CTC TCC CAG CTG ATC GGC TGT GGC CTG CTG CGG CTA CTC	48
TCA CTC CGG CCC TCC GAA GCC AAG CCC CGG ACA CCA CGG AAG GTC CGG	96
AGA AAG CGG CGA CGG GAG GAG CTG CGA GAG CCC CAG GCA GCT GGT GGC	144
AAT GAG AAA AAG GGT GAC AAG ACT CCA GGC GGC GGG GCA GGC AAT CTC	192
AAG CGA GAC CGA TCT CGA CTG CTC CGG GAC CTG CCT GTC GAC ACC AAG	240
TCC CGG CGG CGG TCG CCT CGC CCT CTC CAC GAG AAC CCC AAC GGC GGC	288
AAA TAC AAA CGC CGC AAC AAG AAG GGC TTG TCC AAA GGC TGC TTT CGC	336
CTG AAG CTC GAC CGG ATC GGC TCC ATG AGC GGT CTG GGA TGT TAG	381

【0041】

【配列番号：5】配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

★トポロジー：線状状

配列の種類：合成DNA

配列

★
ATATGAGCTC ATGCCACCTCT CCCACGCTGAT C

31

【0042】

【配列番号：6】配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

★トポロジー：線状状

40 配列の種類：合成DNA

配列

★
TACGCTCGAC TAACTATCCCA GACCGCTCTAT

30

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のCNPを用いて作成したCNP载体全

用いたRIAにより測定したヒト脳中のCNP様活性を示すグラフである。

[圖 1]

